

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-226380

(P2002-226380A)

(43) 公開日 平成14年8月14日 (2002. 8. 14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 K 31/737		A 6 1 K 31/737	2 G 0 4 J
A 6 1 P 1/02		A 6 1 P 1/02	4 C 0 8 6
1/16		1/16	4 C 0 9 0
9/10		9/10	
11/00		11/00	
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-27058(P2001-27058)

(22) 出願日 平成13年2月2日 (2001. 2. 2)

(71) 出願人 000113908

マルホ株式会社

大阪府大阪市北区中津一丁目6番22号

(72) 発明者 渡部 英基

京都府京都市下京区中堂寺栗田町1番地

マルホ株式会社中央研究所内

(72) 発明者 片岡 正憲

京都府京都市下京区中堂寺栗田町1番地

マルホ株式会社中央研究所内

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外8名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多硫酸化多糖類によるTIMP産生の亢進

(57) 【要約】

【課題】マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患の予防および/または治療薬、並びにTIMPの産生を亢進する物質をスクリーニングする方法の提供。

【解決手段】多硫酸化多糖を有効成分として含むマトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患の予防および/または治療薬並びに滑膜細胞にスクリーニングすべき物質を添加し、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害物質の産生量を測定し、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害物質の産生を亢進する物質をスクリーニングする方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】多硫酸化多糖を有効成分として含むマトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患の予防および／または治療薬。

【請求項2】多硫酸化多糖が多硫酸化ムコ多糖である請求項1に記載の予防および／または治療薬。

【請求項3】マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患が、軟骨疾患、癌、口腔疾患、眼疾患、皮膚疾患、神経疾患、腎疾患、呼吸器疾患、肝臓疾患および心血管性疾患からなる群から選択される疾患である請求項1または2に記載の予防および／または治療薬。

【請求項4】マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患が、軟骨疾患である請求項1～3のいずれかに記載の予防および／または治療薬。

【請求項5】滑膜細胞にスクリーニングすべき物質を添加し、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害物質の産生量を測定し、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害物質の産生を亢進する物質をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、多硫酸化多糖（以下、PSとする）を有効成分として含むマトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患の予防および／または治療薬、並びに滑膜細胞にスクリーニングすべき物質を添加し、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害物質（tissue inhibitor of metalloproteinase：以下、TIMPとする）の産生を測定し、TIMPの産生を亢進する物質をスクリーニングする方法に関する。

【0002】

【従来の技術】細胞外マトリックスは、細胞の保持作用に留まらず、細胞の増殖・分化、サイトカインや増殖因子との結合によるマクロライン作用など、広く細胞機能の維持に重要な役割を果たしている。したがって、細胞外マトリックスの分解は、排卵や子宮内膜剥離および受精卵の着床、組織・臓器の形成、血管形成、骨吸収、創傷治癒など多くの生理的状態において認められている。また、細胞外マトリックスの過剰な分解は、種々の病的状態における組織破壊や癌細胞浸潤・転移などで見られる。このように生理的および病的細胞外マトリックス分解にマトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase：以下MMPとする）が、中心的役割を果たしている。MMPに係わる疾患としては、軟骨破壊（慢性関節リウマチ症、変形性関節炎）、癌細胞浸潤・転移、口腔疾患（歯周炎）、眼疾患（角膜潰瘍、糖尿病性網膜症、増殖性硝子体網膜症）、皮膚疾患（水疱性疾患、慢性潰瘍）、神経疾患（多発性硬化症、成人T細胞白血病性脊髄症、細菌性網膜症、自己免疫性脳脊髄症）、腎疾患（糸球体腎炎、糖尿病性腎炎、ループス腎炎）、呼吸器疾患（肺気腫、気管支喘息、慢性気管支炎、間質性肺炎、人呼吸促進症候群）、肝臓疾患（慢性

肝炎、肝硬変）、心血管性疾患（原発性心筋症、心不全、動脈硬化症、血管炎、動脈瘤）などが知られている。また、MMPに共通の内因性インヒビターとしてTIMPがあり、MMPと同様にTIMPも種々の正常細胞や癌細胞が産生する。TIMPの一義的な機能は、活性型MMPの活性を阻害することである。現在TIMPはTIMP-1、TIMP-2、TIMP-3およびTIMP-4が知られている。軟骨マトリックスは、主にコラーゲンとプロテオグリカンから構成されている。コラーゲンは軟骨乾燥重量の約60%を占める主要成分であり、軟骨マトリックスにおいて他のプロテオグリカンと結合しマトリックスの構築に重要な働きをしている。軟骨型プロテオグリカンはアグリカンと呼ばれ、コアタンパク質にコンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、オリゴ糖を側鎖とする巨大分子で、親水性の分子構造を有するため多くの水分子を含み、軟骨特異的な粘弾性に寄与している。MMP-3は軟骨マトリックスの構成上重要なコラーゲン、アグリカンおよびリンクタンパク質などを分解する能力も持ち、また他のMMPの活性を亢進させる働きを持っているため軟骨破壊のキー・エンザイムと考えられている。そして、MMP-3活性は、関節炎により軟骨が破壊されている患者では健常者と比較して高濃度であることが明らかとなっている。また、リウマチ患者におけるパンヌスを軟骨の接触面において、MMP-2の膜型MMP-1（MT1-MMP）による活性化を介して軟骨が分解されることが明らかになっている。従って、TIMPの産生を亢進することによってMMPによる軟骨マトリックスの分解を抑制し、MMPが関与するマトリックス分解に関連する種々の疾患を予防および／または治療できる可能性がある。

【0003】一方、PSは、多糖を多硫酸化したものである。PSの中でも多硫酸化ムコ多糖（以下、MPSとする）の薬理作用としては、血液凝固抑制作用、末梢血液循環促進作用、角質水分保持作用などが知られているが、TIMPとの関係は知られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、MMP関連疾患の予防および／または治療薬、並びにMMPの阻害物質であるTIMPの産生を亢進する物質のスクリーニング方法の提供を目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは従来技術の問題点に鑑み鋭意検討を重ねた結果、PSがTIMPの産生を亢進することを見出した。すなわち、本発明は以下の予防および／または治療薬、並びにスクリーニング方法を提供するものである。

項1. 多硫酸化多糖を有効成分として含むマトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患の予防および／または治療薬。

項2. 多硫酸化多糖が多硫酸化ムコ多糖である項1に記

載の予防および／または治療薬。

項3. マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患が、軟骨疾患、癌、口腔疾患、眼疾患、皮膚疾患、神経疾患、腎疾患、呼吸器疾患、肝臓疾患および心血管性疾患からなる群から選択される疾患である項1または2に記載の予防および／または治療薬。

項4. マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患が、軟骨疾患である項1～3のいずれかに記載の予防および／または治療薬。

項5. 滑膜細胞にスクリーニングすべき物質を添加し、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害物質の産生を測定し、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害物質の産生を亢進する物質をスクリーニングする方法。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明における多硫酸化多糖（PS）とは、多糖のうち、硫酸基を単糖当たり通常平均0.55～5個、好ましくは平均0.6～2.9個、より好ましくは平均0.7～2個の割合で有するものである。

【0007】PSを構成する単糖としては、D-グルコサミン、D-ガラクトサミン、D-グルクロン酸、L-イズロン酸、D-グルコース、D-ガラクトース、D-キシロース、D-ガラクトツロン酸、D-マンヌロン酸等が例示され、PSは、これら単糖の1種又は2種以上を繰り返し単位とする多糖に硫酸基が導入されたものを意味する。天然由来の多糖には、硫酸基を持つものも存在するので、それらをさらに化学的に多硫酸化したものもPSに包含される。例えば、多硫酸化ムコ多糖である。また、デンブ、セルロース、グアガム、アラビアゴム、コンニャクマンナン、寒天アガロース、アミロペクチンなどの多糖を硫酸化した化合物などもPSに包含される。これらPSは単独でも2種以上を組み合わせて使用してもよい。好ましいPSは、多硫酸化ムコ多糖（MPS）である。MPSの具体例としては、ヘパリン、コンドロイチンポリ硫酸と呼ばれるコンドロイチン硫酸Dやコンドロイチン硫酸E、ケラタンポリ硫酸、コンドロイチン硫酸等である。また、キチン、ヒアルロン酸を硫酸化したものも挙げられる。より好ましいMPSとしてはコンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸の多硫酸化物が挙げられる。

【0008】また、PSは、必要に応じてナトリウム、カリウム等のアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミン類等を用いる増塩反応により得られる生理学的に許容される塩形態も包含する。

【0009】PSの平均分子量は、1000～10000000程度であり、好ましくは5000～1000000程度、より好ましくは10000～1000000程度である。

【0010】多糖に硫酸基を導入する方法は既知の方法により行われる。例えば、先ず、原料の多糖1gに対

し、氷冷した溶媒を10～30ml用意し、これに硫酸化剤を原料多糖1gに対して2～6倍加える。この溶媒に、原料の多糖1gを加え、0℃～100℃で、1～10時間反応させて、硫酸化を行う。使用する溶媒としては、ピリジン、N, N-ジメチルホルムアルデヒド、N, N-ジアルキルアクリルアミド等が使用でき、硫酸化剤としては、クロロスルホン酸、トリエチルアミン-サルファトリオキサイド錯塩等が使用できる。

【0011】また、例えば、多糖と硫酸化剤を適当な溶媒中で加温し、反応させる方法が挙げられる。硫酸化剤としては、多硫酸化の目的を達成することができるものであれば特に限定されるものではないが、無水硫酸とピリジン若しくはトリエチルアミン等の錯体を使用するのが好ましい。多糖と硫酸化剤の使用割合は、所望の多硫酸化多糖の硫酸化率（又は硫酸含有率）及び反応条件に従って任意に選択することができるが、一般に、多糖類1重量部に対して2～10重量部となるような割合で使用する。溶媒としては、例えば、ジメチルホルムアミド等の親プロトン性溶媒を挙げることができる。反応温度、反応時間としては、所望の硫酸化率が達成できる限り特に限定されないが、例えば、40～90℃で30分～20日間程度反応させる。

【0012】上述のようにして生成したPSは、各種修飾多糖類の製造で常用されている精製操作により精製することができる。例えば、中和、透析による脱塩、有機溶媒添加による沈殿を回収する操作、凍結乾燥による回収操作などが挙げられる。

【0013】本発明の予防および／または治療薬は、経口投与、局所投与、または非経口投与などの形態で投与され、治療目的、方法等に応じて適切な形態が選択される。非経口投与の形態としては、経皮、関節内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、胸腔内、脊髓腔内投与や、点滴法、注腸、経直腸、点眼、点鼻、粘膜への塗布投与等が挙げられるが、患部への直接投与も可能である。好ましい投与方法は関節内、経皮である。

【0014】本発明の予防および／または治療薬の製剤形態としては、溶液製剤、分散製剤、半固形製剤、粉粒製剤、成型製剤、浸出製剤などがあげられる。例えば、錠剤、被覆錠剤、糖衣剤、丸剤、トロチ剤、硬カプセル剤、マイクロカプセル剤、埋込剤、粉末剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、注射剤、液剤、エリキシル剤、エマルジョン剤、シロップ剤、水剤、乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション剤、エアゾール剤、スプレー剤、吸入剤、噴霧剤、軟膏製剤、硬膏製剤、貼付剤、パスタ剤、バップ剤、テープ剤、クリーム剤、油剤、坐剤、チンキ剤、皮膚用水剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、塗布剤、輸液剤、凍結乾燥製剤、ゲル調製品や、注射剤などのための粉粒剤などが挙げられる。好ましい製剤の形態としては、軟膏製剤、注射剤、貼付剤、テープ剤が挙げられる。

【0015】医薬組成物は通常の方法に従って製剤化することができる。例えば、適宜必要に応じて、生理的に認められた担体、医薬として許容される担体、アジュバント剤、賦形剤、補形剤、防腐剤、安定化剤、結合剤、pH調節剤、緩衝剤、界面活性剤、基剤、溶剤、充填剤、増量剤、溶解補助剤、可溶化剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、崩壊剤、噴射剤、保存剤、抗酸化剤、遮光剤、保湿剤、緩和剤などを単独もしくは組み合わせ用い、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で製造する。

【0016】本発明の予防および／または治療薬の投与量は、患者の年齢、性別、疾病の種類及び程度、並びに剤型及び投与様式により、適宜決定される。また、製剤中のPSの含有量は、使用条件に応じて適宜決定されるが、軟膏製剤の場合、好ましくは、0.01～20重量%程度、さらに好ましくは0.05～10重量%程度、より一層好ましくは0.1～5重量%程度である。

【0017】軟膏剤に配合される添加剤としては、基剤、乳化剤、保存剤等が挙げられる。基剤としては白色ワセリン、流動パラフィン等の炭化水素、大豆等の油脂類、ミツロウ、ラノリン等のロウ類、ステアリン酸、オレイン酸等の脂肪酸、ラノリンアルコール、セトステアリンアルコール等の高級アルコール及びそのエステル類、マクロゴール等が挙げられる。乳化剤としては、非イオン性界面活性剤等が挙げられる。保存剤としては、チモール、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル等が挙げられる。

【0018】PSの示すTIMPの産生を亢進する作用によって予防および／または治療され得る疾患は、MMPの分解活性とそれを抑制する物質（例えばTIMP）とのバランスがMMP側に偏るために生じる疾患（以下、MMP関連疾患とする）である。MMP関連疾患としては、例えば、軟骨疾患、癌、口腔疾患（歯周炎など）、眼疾患（角膜潰瘍、糖尿病性網膜症、増殖性硝子体網膜症など）、皮膚疾患（水疱性疾患、慢性潰瘍など）、神経疾患（多発性硬化症、成人T細胞白血病性脊髄症、細菌性網膜症、自己免疫性脳脊髄症など）、腎疾患（糸球体腎炎、糖尿病性腎炎、ループス腎炎）、呼吸器疾患（肺気腫、気管支喘息、慢性気管支炎、間質性肺炎、人呼吸促進症候群など）、肝臓疾患（慢性肝炎、肝硬変など）、心血管性疾患（原発性心筋症、心不全、血管炎、動脈瘤など）等が挙げられる。なお、軟骨疾患とは、軟骨、滑膜、滑液等の関節構成組織において、MMPの分解活性とそれを抑制する物質（例えばTIMP）とのバランスがMMP側に偏るために生じる疾患をいう。

【0019】PSは、MMP関連疾患の中でも、軟骨疾患に対して有用である。特に、MMPは軟骨の主要な構成要素であるコラーゲン、アグリカンおよびリンクタン

パク質を分解するため、MMPを阻害するTIMPの産生を亢進するPSは軟骨の保護に有用であり、軟骨疾患の予防および／または治療薬として重要である。軟骨疾患の具体例としては、骨軟骨腫、内軟骨腫、軟骨肉腫がある。また、転移性骨腫瘍、骨転移癌にも有効である。

【0020】本発明のスクリーニング方法において、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害物質（TIMP）の測定方法としては、TIMPを抗原抗体反応により測定する方法、免疫組織染色法などが挙げられる。

【0021】

【実施例】本発明を以下の実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。尚、実施例で使用するヘパリン類似物質は日本薬局方外医薬品規格（1993）に基づくものである。

【0022】〔細胞の調製〕滑膜細胞（RASC）の分離 ヒトRA患者から単離した滑膜組織を細断し、細断した滑膜組織をD-MEM（ダルベッコ変法イーグル培地）中で細胞分散用コラゲナーゼ（2.0 mg/mL）により37℃で3時間消化し、続いてトリプシン（0.25%）により37℃で30分消化した。得られた付着性細胞は20%FBS含有D-MEM中で培養した（37℃、5%CO₂）。細胞を1×10⁶ cells/mLの濃度で、10%DMSOを含むD-MEMに懸濁し、液体窒素中で凍結保存した。凍結保存中のRASCを37℃の恒温槽で加温溶解し、約14 mLのD-MEM培地の入った遠沈管に細胞を移した。遠心（800 rpm, 5 min）後、上清を捨てた。培地で再懸濁した細胞を、培養フラスコ（F-75）に移し、培養（37℃、5%CO₂）した。

【0023】〔試薬含有培地の調整〕IL-1αを含有するD-MEM培地（400 units/mL）を調製した。ヘパリン類似物質を様々な濃度（4, 0.4, 0.04及び0.004 mg/mL）で含有するD-MEM培地を調製した。また、ヘパリンを様々な濃度（4及び0.4 mg/mL）で含有するD-MEM培地を調製した。インドメタシンを含有するD-MEM培地（4×10⁻⁵ M）を調製した。

【0024】〔RASC培養液への試薬の投入〕RASCを2×10⁴ cells/cm²となるように96穴プレートに播種し、37℃でコンフルエントになるまで培養した。培地を新しい培地120 μLに交換し、IL-1α（400 units/mL）を60 μL加えると同時に、上記のように調製したヘパリン類似物質含有培地、インドメタシン含有培地もしくはヘパリン含有培地を各々60 μL加え、それぞれ37℃で5日間インキュベートした。培養上清を回収し、遠心（5,000 rpm）して浮遊物を沈殿させ、その上清をサンプルとした。

【0025】〔ウェスタンブロット方法〕上記サンプルを12.5%のポリアクリルアミド電気泳動により分子量で分離した後、セミドライ法によりポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜にタンパク質を転写した。タンパク質の非特異的吸着を防ぐためPVDF膜をブロックエース（大日本製薬製）で一晩（4℃）ブロッキングした。PBS（リ

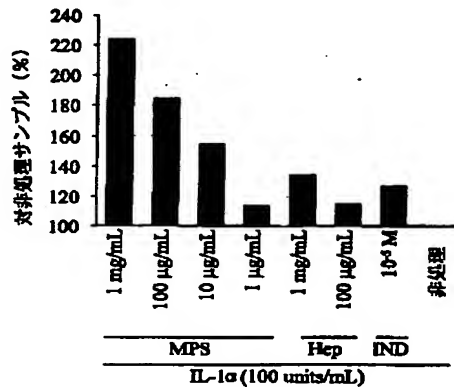
ン酸緩衝化生理食塩水)で洗浄後、1%ウシ血清アルブミン (BSA) 含有PBSで250倍希釈した (BSA/PBS)。マウス抗ヒトTIMP-3モノクローナルIgG (富士薬品工業株式会社) を一次抗体として反応させ、次いで1%BSA/PBSで5000倍希釈したHRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) 標識抗マウスIgG抗体 (Amersham Pharmacia製) を二次抗体として用い標識した。ECL system (Amersham Pharmacia製) を用いた蛍光をX線フィルムに感光させ、

得られたバンドの濃度をNIH imageでコンピューター解析し、数値化した。得られた数値を図1に示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】非処理サンプルに対するヘパリン類似物質、ヘパリンおよびインドメタシン処理サンプルのTIMP産生相対量を示すグラフである。なお、グラフ中、MPS、HepおよびINDは、それぞれヘパリン類似物質、ヘパリンおよびインドメタシンを表す。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
A 6 1 P 13/12		A 6 1 P 13/12	
17/00		17/00	
19/00		19/00	
25/00		25/00	
35/00		35/00	
37/02		37/02	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
C 0 8 B 5/14		C 0 8 B 5/14	
31/06		31/06	
37/08		37/08	
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
33/50		33/50	Z
// C 0 8 B 37/00		C 0 8 B 37/00	H

(72)発明者 木戸 裕子
京都府京都市下京区中堂寺栗田町1番地
マルホ株式会社中央研究所内
(72)発明者 成瀬 友裕
京都府京都市下京区中堂寺栗田町1番地
マルホ株式会社中央研究所内

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB10 BB20 CB01 FB01
FB03 FB05 JA01
4C086 AA01 AA02 EA26 MA01 MA04
NA14 ZA01 ZA33 ZA36 ZA59
ZA67 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96
ZB26
4C090 AA09 BA08 BA15 BA27 BA66
BB63 BB95 DA23